

U.S. PTO
JC835 10/1020513
12/18/01

PATENT
Attorney Docket No. 32301W247

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:)
Brigitte BATHE, et al.) Examiner: To Be Assigned
Serial No. : Unassigned) Group Art Unit: To Be Assigned
Filed: December 18, 2001)

For : **NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE ILV_E GENE**

CLAIM FOR FOREIGN PRIORITY TRANSMITTAL

Asst. Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

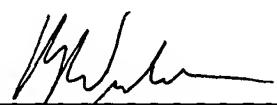
Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119, Applicants hereby claim the benefit of the filing date of German Patent Appln. No. 100 63 314.5, filed in Germany on December 20, 2000.

In support of this priority claim, Applicants submit herewith a certified copy of the priority application.

Respectfully submitted,

SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By: 

Robert G. Weilacher, Reg. No 20,531
1850 M Street, N.W., Suite 800
Washington, D.C. 20036
Telephone: (202) 659-2811
Facsimile: (202) 263-4329

Dated: December 18, 2001

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



JC835 U.S. PTO
10/020513
12/18/01

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 63 314.5

Anmeldetag: 20. Dezember 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Neue für das ilvE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

IPC: C 12 N, C 07 H, C 12 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 7. November 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Waasmaier

Neue für das ilvE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das ilvE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren

5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das ilvE-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin und L-Phenylalanin, finden in der Humanmedizin und in der 10 pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der

15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die 20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und 30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von

L-Aminosäure produzierenden Stämmen von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-15 Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt sind L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin und L-Phenylalanin.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das 20 ilvE-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 25 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den 30 Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

5 wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der Transaminase E aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, 10 oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz 15 (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i), die die Aktivität des Proteins/Polypeptides nicht verändern

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind schließlich Polynukleotide ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den 25 Positionen 1 und 220,
- b) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 221 und 1324,

c) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 1325 und 1453.

5 Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

10 ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

15 coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in denen das ilvE-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, 20 die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

25 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für die Transaminase E kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu 30 isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit des ilvE-Gens aufweisen. Sie sind ebenso zum Einbau in sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“

geeignet, um die entsprechenden Polynukleotide zu detektieren und zu bestimmen

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren

5 Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für die Transaminase E kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt

10 mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oder 40, oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 15 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

20 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

25 Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens besonders 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 30 97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragmentes.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid 5 gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Transaminase E und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 10 97% oder 99% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L- 15 Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L- Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L- Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L- Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen 20 die für das ilvE-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die 25 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

30 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der

Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

5 Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
10 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
 Corynebacterium melassecola ATCC17965
 Brevibacterium flavum ATCC14067
 Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
15 *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme.

Das neue, für das Enzym Transaminase E (EC 2.6.1.42) kodierende *ilvE*-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

20 Zur Isolierung des *ilvE*-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel
25 seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032,

die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

5 Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326) (1992) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHC79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

10 Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirsche eignen sich 15 besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in 20 gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

25 Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

30 Die neue für das Gen *ilvE* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins

abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des ilvE-Genproduktes dargestellt. Es ist bekannt, daß wirtseigene Enzyme die N-terminale Aminosäure Methionin bzw. Formylmethionin des gebildeten Proteins 5 abspalten können.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID 10 ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner 15 grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Derartige Mutationen werden unter anderem auch als neutrale Substitutionen bezeichnet. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht 20 wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et 25 al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

30 In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich

aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im

5 Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten

10 Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschritte durch

15 Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, 20 Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70%

25 Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der

30 35 Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von

50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur

5 Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe

10 der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

15 Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des ilvE-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die

20 Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare

25 Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des

30 Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung

der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei

5 Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei

10 Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift

15 JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße *ilvE*-Gen

20 beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554),

25 pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHs2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS

30 Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch

35 Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es

beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige

5 Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73

10 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf

15 et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode

20 der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan

25 (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"- Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

30 Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem *ilvE*-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphatzzyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls

35 regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des ilvE-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),
- das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),
- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr) (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen ilvBN (EP-B 0356739),
- das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),

- das für die 3-Isopropylmalate Dehydrogenase kodierende Gen leuB (Patek et al. (1998) Applied and Microbiology Biotechnologie 50: 42-47)

5 • das für den Valin-Export kodierenden Gen brnE (DE: 19951708.8)

- das für die Isopropylmalate synthase kodierende Gen leuA (Patek et al. (1994) Applied and Environmental Microbiology 60 (1): 133-140)

10 • das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998))

- das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

15 Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des ilvE-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),

20 • das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),

- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478; DSM 12969),

- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),

25 • das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *ilvE*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama:

5 "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können

10 kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte

15 Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

20 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 25 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, 30 Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff, oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird

normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

15 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) 20 durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

25 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wird wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) 30 beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,

Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wird mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)

5 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wird mit dem 10 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

15 Anschließend wird die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wird mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, 20 Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wird anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

25 Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) werden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular 30 Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert werden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden rekombinante Einzelklone selektiert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des ilvE-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wird mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, 5 Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente werden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, 10 Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgt die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, 15 Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wird mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, 20 Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wird wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring 25 Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wird. Dieses Ligationsgemisch wird anschließend in den *E. coli* Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 30 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgt mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden,

Deutschland). Die Sequenzierung erfolgt nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wird der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgt in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten werden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate werden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wird mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergibt ein offenes Leseraster von 1103 Basenpaaren, welches als *ilvE*-Gen bezeichnet wird. Das *ilvE*-Gen kodiert für ein Protein von 367 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das ilvE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000759 BT

10 <140>

<141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1453

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (221)..(1321)

25 <223> ilvE-Gen

<400> 1

ccttgggtgg tgctgttgtg ctgttaggcat ttttcgcat tgaaagctga gtccctctcg 60

30 tgaagttgtg tctccgcctt gggtggggga ggcataat tgaaactaac ttttaacaag 120

cctagccatt cctcaaaacc gtgagacgaa attggctatt catcccataa aatggggctg 180

actagtgtat ctgtcaggta gcaggtgtac cttaaaatcc atg acg tca tta gag 235
Met Thr Ser Leu Glu

1

5

ttc aca gta acc cgt acc gaa aat ccg acg tca ccc gat cgt ctg aag 283
Phe Thr Val Thr Arg Thr Glu Asn Pro Thr Ser Pro Asp Arg Leu Lys
10 15 2040 gaa att ctt gcc gca ccg aag ttc ggt aag ttc ttc acc gac cac atg 331
Glu Ile Leu Ala Ala Pro Lys Phe Gly Lys Phe Phe Thr Asp His Met
25 30 3545 gtg acc att gac tgg aac gag tcg gaa ggc tgg cac aac gcc caa tta 379
Val Thr Ile Asp Trp Asn Glu Ser Glu Gly Trp His Asn Ala Gln Leu
40 45 5050 gtg cca tac gcg ccg att cct atg gat cct gcc acc acc gta ttc cac 427
Val Pro Tyr Ala Pro Ile Pro Met Asp Pro Ala Thr Thr Val Phe His
55 60 6555 tac gga cag gca att ttt gag gga att aag gcc tac cgc cat tcg gac 475
Tyr Gly Gln Ala Ile Phe Glu Gly Ile Lys Ala Tyr Arg His Ser Asp
70 75 80 8555 gaa acc atc aag act ttc cgt cct gat gaa aac gcc gag cgt atg cag 523
Glu Thr Ile Lys Thr Phe Arg Pro Asp Glu Asn Ala Glu Arg Met Gln
90 95 100

	cgt tca gca gct cga atg gca atg cca cag ttg cca acc gag gac ttt	571
	Arg Ser Ala Ala Arg Met Ala Met Pro Gln Leu Pro Thr Glu Asp Phe	
	105 110 115	
5	att aaa gca ctt gaa ctg ctg gta gac gcg gat cag gat tgg gtt cct	619
	Ile Lys Ala Leu Glu Leu Leu Val Asp Ala Asp Gln Asp Trp Val Pro	
	120 125 130	
10	gag tac ggc gga gaa gct tcc ctc tac ctg cgc cca ttc atg atc tcc	667
	Glu Tyr Gly Gly Glu Ala Ser Leu Tyr Leu Arg Pro Phe Met Ile Ser	
	135 140 145	
15	acc gaa att ggc ttg ggt gtc agc cca gct gat gcc tac aag ttc ctg	715
	Thr Glu Ile Gly Leu Gly Val Ser Pro Ala Asp Ala Tyr Lys Phe Leu	
	150 155 160 165	
	gtc atc gca tcc cca gtc ggc gct tac ttc acc ggt gga atc aag cct	763
	Val Ile Ala Ser Pro Val Gly Ala Tyr Phe Thr Gly Gly Ile Lys Pro	
	170 175 180	
20	gtt tcc gtc tgg ctg agc gaa gat tac gtc cgc gct gca ccc ggc gga	811
	Val Ser Val Trp Leu Ser Glu Asp Tyr Val Arg Ala Ala Pro Gly Gly	
	185 190 195	
25	act ggt gac gcc aaa ttt gct ggc aac tac gcg gct tct ttg ctt gcc	859
	Thr Gly Asp Ala Lys Phe Ala Gly Asn Tyr Ala Ala Ser Leu Leu Ala	
	200 205 210	
30	cag tcc cag gct gcg gaa aag ggc tgg gac cag gtc gta tgg ttg gat	907
	Gln Ser Gln Ala Ala Glu Lys Gly Cys Asp Gln Val Val Trp Leu Asp	
	215 220 225	
35	gcc atc gag cac aag tac atc gaa gaa atg ggt ggc atg aac ctt ggg	955
	Ala Ile Glu His Lys Tyr Ile Glu Glu Met Gly Gly Met Asn Leu Gly	
	230 235 240 245	
	ttc atc tac cgc aac ggc gac caa gtc aag cta gtc acc cct gaa ctt	1003
	Phe Ile Tyr Arg Asn Gly Asp Gln Val Lys Leu Val Thr Pro Glu Leu	
	250 255 260	
40	tcc ggc tca cta ctt cca ggc atc acc cgc aag tca ctt cta caa gta	1051
	Ser Gly Ser Leu Leu Pro Gly Ile Thr Arg Lys Ser Leu Leu Gln Val	
	265 270 275	
45	gca cgc gac ttg gga tac gaa gta gaa gag cga aag atc acc acc acc	1099
	Ala Arg Asp Leu Gly Tyr Glu Val Glu Arg Lys Ile Thr Thr Thr	
	280 285 290	
50	gag tgg gaa gaa gac gca aag tct ggc gcc atg acc gag gca ttt gct	1147
	Glu Trp Glu Glu Asp Ala Lys Ser Gly Ala Met Thr Glu Ala Phe Ala	
	295 300 305	
55	tgc ggt act gca gct gtt atc acc cct gtt ggc acc gtg aaa tca gct	1195
	Cys Gly Thr Ala Ala Val Ile Thr Pro Val Gly Thr Val Lys Ser Ala	
	310 315 320 325	
	cac ggc acc ttc gaa gtg aac aac aat gaa gtc gga gaa atc acg atg	1243
	His Gly Thr Phe Glu Val Asn Asn Asn Glu Val Gly Glu Ile Thr Met	
	330 335 340	

aag ctt cgt gaa acc ctc acc gga att cag caa gga aac gtt gaa gac 1291
 Lys Leu Arg Glu Thr Leu Thr Gly Ile Gln Gln Gly Asn Val Glu Asp
 345 350 355

5 caa aac gga tgg ctt tac cca ctg gtt ggc taaatcaacc gggtttaaga 1341
 Gln Asn Gly Trp Leu Tyr Pro Leu Val Gly
 360 365

10 ccccgctgca ttaaaccctg atttattgca gcggggtttt tgcgttgaca agctcttatg 1401
 agacgttaggg ggtggaagca ggggttaggac gtgtccagcc caagtggcat gc 1453

15 <210> 2
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

20 <400> 2
 Met Thr Ser Leu Glu Phe Thr Val Thr Arg Thr Glu Asn Pro Thr Ser
 1 5 10 15

25 Pro Asp Arg Leu Lys Glu Ile Leu Ala Ala Pro Lys Phe Gly Lys Phe
 20 25 30

Phe Thr Asp His Met Val Thr Ile Asp Trp Asn Glu Ser Glu Gly Trp
 35 40 45

30 His Asn Ala Gln Leu Val Pro Tyr Ala Pro Ile Pro Met Asp Pro Ala
 50 55 60

Thr Thr Val Phe His Tyr Gly Gln Ala Ile Phe Glu Gly Ile Lys Ala
 65 70 75 80

35 Tyr Arg His Ser Asp Glu Thr Ile Lys Thr Phe Arg Pro Asp Glu Asn
 85 90 95

40 Ala Glu Arg Met Gln Arg Ser Ala Ala Arg Met Ala Met Pro Gln Leu
 100 105 110

Pro Thr Glu Asp Phe Ile Lys Ala Leu Glu Leu Leu Val Asp Ala Asp
 115 120 125

45 Gln Asp Trp Val Pro Glu Tyr Gly Gly Glu Ala Ser Leu Tyr Leu Arg
 130 135 140

50 Pro Phe Met Ile Ser Thr Glu Ile Gly Leu Gly Val Ser Pro Ala Asp
 145 150 155 160

Ala Tyr Lys Phe Leu Val Ile Ala Ser Pro Val Gly Ala Tyr Phe Thr
 165 170 175

55 Gly Gly Ile Lys Pro Val Ser Val Trp Leu Ser Glu Asp Tyr Val Arg
 180 185 190

Ala Ala Pro Gly Gly Thr Gly Asp Ala Lys Phe Ala Gly Asn Tyr Ala
 195 200 205

Ala Ser Leu Leu Ala Gln Ser Gln Ala Ala Glu Lys Gly Cys Asp Gln
210 215 220

5 Val Val Trp Leu Asp Ala Ile Glu His Lys Tyr Ile Glu Glu Met Gly
225 230 235 240

Gly Met Asn Leu Gly Phe Ile Tyr Arg Asn Gly Asp Gln Val Lys Leu
245 250 255

10 Val Thr Pro Glu Leu Ser Gly Ser Leu Leu Pro Gly Ile Thr Arg Lys
260 265 270

Ser Leu Leu Gln Val Ala Arg Asp Leu Gly Tyr Glu Val Glu Glu Arg
275 280 285

15 Lys Ile Thr Thr Thr Glu Trp Glu Glu Asp Ala Lys Ser Gly Ala Met
290 295 300

Thr Glu Ala Phe Ala Cys Gly Thr Ala Ala Val Ile Thr Pro Val Gly
20 305 310 315 320

Thr Val Lys Ser Ala His Gly Thr Phe Glu Val Asn Asn Asn Glu Val
325 330 335

25 Gly Glu Ile Thr Met Lys Leu Arg Glu Thr Leu Thr Gly Ile Gln Gln
340 345 350

Gly Asn Val Glu Asp Gln Asn Gly Trp Leu Tyr Pro Leu Val Gly
355 360 365

30

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das ilvE-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - 15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c)wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der
 - 20 Transaminase E aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
 - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
 - (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.

10. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.

15. 8. Coryneformen Bakterien, in denen das ilvE-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.

9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin und L-Phenylalanin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:

20. a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das ilvE-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;

25. b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der L-Aminosäure.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
5
11. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
10
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das *ilvE*-Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.
15
13. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das *ilvE*-Gen kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere überexprimiert.
20
14. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die regulatorischen bzw. katalytischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid *ilvE* kodiert.
25
15. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
30
 - 15.1 das für die Dihydridipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA*,

15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen *gap*,

15.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen *tpi*,

5 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen *pgk*,

15.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen *zwf*,

10 15.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen *pyc*,

15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen *mgo*,

15.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen *lysC*,

15 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE*,

15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen *hom*,

20 15.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen *ilvA* oder das für eine feed back resistente Threonin-Dehydratase kodierende Allel *ilvA(Fbr)*,

15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen *ilvBN*,

25 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD*,

15.14 das für das Zwal-Protein kodierende Gen *zwal* verstärkt bzw. überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

5

16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck*,

16.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi*,

10

16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*

16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* abschwächt.

17. Coryneformen Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.

15

18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.

19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für die Transaminase E kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des *ilvE*-Gens aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß man das Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungssonden einsetzt.

25

20. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man arrays, micro arrays oder DNA-chips einsetzt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das *ilvE*-Gen verstärkt vorliegt, und die 20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfundungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.